



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/10, 15/12, 15/54 C12N 15/85, C07K 15/28 A61K 39/395, G01N 33/577	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/12228 (43) Date de publication internationale: 24 juin 1993 (24.06.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/01178 (22) Date de dépôt international: 11 décembre 1992 (11.12.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/15389 11 décembre 1991 (11.12.91). FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KALLENBACH, Sacha [FR/FR]; 77, avenue Félix-Faure, F-92000 Nanterre (FR). DOYEN, Noëlle [FR/FR]; 20, rue Soufflot, F-75005 Paris (FR). ROUGEON, François [FR/FR]; Route de St-Léger, F-78120 Poigny-la-Forêt (FR).		(74) Mandataire: MICHELET, Alain; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR GENERATING STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY IN A PEPTIDE SEQUENCE (54) Titre: PROCEDE DE GENERATION D'UNE DIVERSITE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DANS UNE SEQUENCE PEPTIDIQUE (57) Abstract <p>A method for generating structural and functional diversity in a peptide sequence by randomly deleting and inserting nucleotides in a nucleotide sequence which codes for said peptide sequence. The method may be carried out by transfecting a cell preparation with vectors for expressing the Rag-1 and Rag-2 genes and optionally the deoxynucleotidyl transferase terminal gene, as well as with a vector including the nucleotide sequence which codes for said peptide sequence.</p> (57) Abrégé <p>Procédé de génération d'une diversité structurale fonctionnelle dans une séquence peptidique par délétions et insertions aléatoires de nucléotides dans une séquence nucléotidique codant pour ladite séquence peptidique. Ce procédé peut être mis en œuvre par transfection d'une préparation cellulaire par des vecteurs permettant une expression des gènes Rag-1 et Rag-2 et éventuellement du gène de la terminale désoxynucléotidyle transférase ainsi que par un vecteur portant la séquence nucléotidique codant pour ladite séquence peptidique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE DE GENERATION D'UNE DIVERSITE STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DANS UNE SEQUENCE PEPTIDIQUE.

La présente invention a pour objet un procédé
de génération d'une diversité structurale ou
fonctionnelle dans une séquence peptidique par
introduction d'insertions ou délétions de nucléotides
dans la séquence nucléotidique codant pour ladite
séquence peptidique .

La présente invention est d'autre part relative
à des compositions pharmaceutiques , à des médicaments
ou à des réactifs de diagnostic contenant des
protéines ou peptides obtenus par ce procédé .

Les gènes matures codant pour les chaînes
composant les immunoglobulines et les récepteurs des
cellules T sont assemblés précocement lors du
développement des lymphocytes à partir de segments de
gènes dits de variabilité (V) , de soudure , ou de
jonction (J) , et dans certains cas de diversité
(D).

Sept loci sont susceptibles d'être réarrangés
par recombinaison de ces fragments .

Les séquences des signaux de recombinaison
(RSS) adjacentes à chaque gène fournissent les cibles
pour la recombinaison . Ces séquences sont composées
d'un heptamère palindromique et d'un nonamère riche en
adénosine et en thymidine , séparées par une séquence
de 12 ou de 23 paires de base . Les réarrangements
s'opèrent entre des RSS avec des séquences de
séparation de différentes longueurs .

Deux types de jonction ou soudure sont formés
durant la recombinaison : des jonctions codantes
créées par la juxtaposition de segments de gènes et
des jonctions non codantes formées par des RSS
contiguës. Dans ce dernier cas , les heptamères sont

généralement joints sans insertions de nucléotide ou sans délétions . Les jonctions codantes sont quant à elles sujettes à des modifications importantes .

Les variations dans les jonctions au cours du réarrangement des segments de gènes codant pour les immunoglobulines constituent une grande source de diversité . Plusieurs nucléotides peuvent ainsi être éliminés et deux types d'insertion peuvent être trouvés .

L'addition de nucléotides de manière aléatoire résulte dans l'insertion de régions dites régions N sur les chaînes lourdes des immunoglobulines . Il a été émis l'hypothèse (Randau et al ., Molecular and Cellular Biology , 1987 , 3.237-3.243 ; que la désoxynucléotidyle transférase (TdT) est responsable de cette addition aléatoire de nucléotides .

Les insertions de nucléotides de type P correspondent à la répétition inverse des séquences adjacentes à celles des séquences codantes . On a émis l'hypothèse que leur addition correspond à une étape obligatoire du mécanisme de recombinaison .

Des expériences de transfection à l'aide d'ADN génomique ont permis d'isoler deux gènes intervenant de manière active dans la recombinaison : les gènes Rag-1 et Rag-2 (Oettinger et al. , Science , Volume 248, 1517-1523, 1990).

Il a été montré que les gènes Rag-1 et Rag-2 sont responsables de la recombinaison site-spécifique.

Néanmoins, la combinaison des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 ne permet pas de reconstituer la diversité des anticorps trouvés in vivo , c'est-à-dire ne permet pas de rajouter des séquences N .

Diverses méthodes ont été mises au point pour tenter de modifier les chaînes lourdes et légères des

immunoglobulines ou des récepteurs.

Le brevet EP-368.684 concerne une méthode de clonage des séquences nucléotidiques correspondant aux domaines variables des molécules de la famille des immunoglobulines . Cette méthode consiste à fabriquer
5 un ADN complémentaire du domaine variable de l'immunoglobuline .

Le brevet EP-328.444 quant à lui est relatif à une méthode de modification de la structure d'un anticorps tout en conservant sa spécificité fonctionnelle . Ainsi , des domaines constants notamment sont modifiés par une manipulation classique du génie génétique .
10

A la connaissance du demandeur , il n'existe pas de méthode permettant d'obtenir de manière efficace des immunoglobulines modifiées dans leurs structures , et ce avec une grande diversité dans les modifications.
15

Le demandeur s'est donc attaché à la mise en évidence des mécanismes de recombinaison qui permettent à l'organisme d'obtenir une grande diversité dans les immunoglobulines tels que les IgG, les IgM, les IgA, les IgE, et dans les récepteurs des cellules lymphoïdes .
20

Le demandeur s'est aussi attaché à la mise au point d'une méthode générale permettant d'obtenir de manière aléatoire une gamme très diversifiée de mutations , en particulier par insertion aléatoire, dans la séquence nucléotidique correspondant à des protéines, de structures et de fonctions diverses .
25
30

Le demandeur a ainsi montré de manière surprenante , que la combinaison des produits d'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 permet d'obtenir une recombinaison site-spécifique et que

l'introduction de la TdT entraîne une diversité de jonction entre les séquences DJ et VDJ équivalentes à celles trouvées in vivo.

Le demandeur a d'autre part mis en évidence que
5 l'on pouvait en utilisant les produits de Rag-1 et Rag-2 ainsi que la terminale désoxynucléotidyle transférase, obtenir in vitro, la production d'anticorps présentant des réarrangements et qui statistiquement, présentent une grande diversité tant
10 structurelle que fonctionnelle.

La présente invention a donc pour objet une composition contenant en combinaison dans des quantités synergiques les produits d'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 et une terminale
15 désoxynucléotidyle transférase ou un ou plusieurs de leurs fragments biologiquement actifs.

Elle a d'autre part pour objet une composition contenant des séquences nucléotidiques portant les gènes Rag-1 et Rag-2 ou des gènes conduisant à la
20 synthèse de fragments ou de dérivés biologiquement actifs des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 et le gène codant pour la TdT ou un de ses fragments ou dérivés biologiquement actifs, dans laquelle avantageusement les séquences nucléotidiques sont
25 portées par des vecteurs.

Elle est en outre relative à une composition comprenant les plasmides p Blue Rec (Kallenbach et al., Nucléic Acid Research (18, 6730, 1990), p Rag-1 et p Rag-2 (Oettinger et al, précédemment cité).

30 La présente invention a aussi pour objet :

- un procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par délétions ou insertions aléatoires de nucléotides dans une séquence nucléotidique codant

pour cette séquence peptidique , ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs permettant l'expression des produits des gènes Rag-1, Rag-2 et de la terminale désoxynucléotidyle transférase (TdT) ou de leurs dérivés et par un vecteur identique ou différent portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences de recombinaison RSS ou bordée par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS.

- procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par délétions ou insertions aléatoires de nucléotides dans une séquence nucléotidique codant pour cette séquence peptidique, ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un vecteur portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences de recombinaison RSS ou bordée par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS , puis dans une seconde étape par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des produits des gènes Rag-1 , Rag-2 et de la terminale désoxynucléotidyle transférase ou de leurs dérivés .

- procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par introduction dans la séquence nucléotidique correspondant à cette séquence peptidique d'insertions ou de délétions résultant de la répétition inverse de séquences adjacentes à des séquences de recombinaison RSS ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs permettant l'expression des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 ou

de leurs dérivés et par un vecteur identique ou différent portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences RSS ou par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS .

5 - procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par introduction dans la séquence nucléotidique correspondant à cette séquence peptidique d'insertions ou de délétions résultant de la répétition inverse de séquences adjacentes à des séquences de recombinaison RSS , ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un vecteur portant ladite séquence
10 nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences RSS ou par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS , puis dans une seconde étape par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des produits des gènes Rag-1
15 et Rag-2 ou de leurs dérivés .

20 De tels procédés permettent ainsi d'introduire des insertions et des délétions dans des séquences nucléotidiques, de manière aléatoire . Ces modifications de séquences permettent ainsi
25 d'accroître à volonté la diversité biologique.

De telles méthodes sont notamment des substituts intéressants aux méthodes traditionnelles de mutagénèse et aux méthodes d'obtention d'anticorps monoclonaux par les hybridomes.

30 La possibilité d'obtenir des anticorps monoclonaux par une autre méthode que celle des hybridomes est avantageuse en thérapeutique humaine car les préparations d'anticorps obtenues selon l'invention sont pures .

On rappelle que l'on entend par séquences N des insertions aléatoires de nucléotides , c'est-à-dire qui ne sont pas des répliques de séquences préexistantes au voisinage des RSS.

5 Ces séquences N sont donc créées au hasard et de ce fait présentent une très grande diversité, qui n'est pas dépendante de la séquence nucléotidique au voisinage des RSS.

10 Les séquences P sont par contre des insertions résultant de la répétition inverse des séquences adjacentes aux RSS.

De ce fait , elles présentent une moins grande diversité que les régions N.

15 Avantageusement , le ou les vecteurs recombinés portant la séquence nucléotidique correspondant à la séquence peptidique sont transférés dans des bactéries afin de sélectionner les protéines ou les peptides présentant la structure et/ou la fonction souhaitée.

20 Il est à noter qu'il est nécessaire de choisir des vecteurs d'expression des protéines ou peptides adaptés aux cellules, eucaryotes ou procaryotes, utilisées . On peut ainsi utiliser les plasmides pcDNAI (commercialisé par In Vitrogen) ou pRc/CMV (commercialisé par In Vitrogen) pour les cellules
25 eucaryotes ou le plasmide pBlue Script. (commercialisé par Stratagen).

La présente invention est d'autre part relative à une mise en oeuvre préférentielle du procédé pour
30 l'obtention d'immunoglobulines , en particulier d'anticorps présentant une grande diversité structurelle et fonctionnelle par réarrangements séparés des chaînes légères et lourdes composant les immunoglobulines et co-expression dans une même cellule des deux chaînes .

Ainsi , ce mode de mise en oeuvre préférentiel permet d'obtenir une grande quantité de cellules exprimant diverses séquences des deux chaînes des immunoglobulines . Une étape ultérieure permet la
5 sélection de l'immunoglobuline spécifique d'un agent pathogène donné par exemple.

Avantageusement, la séquence correspondant aux chaînes lourdes utilisées ne comprend que la partie Fab. de ces chaînes . La partie Fc est rajoutée
10 ultérieurement.

De manière préférentielle , le réarrangement des chaînes légères est effectué en présence des séquences nucléotidiques des gènes Rag-1 et Rag-2 ou de gènes conduisant à la synthèse de dérivés ou de
15 fragments biologiquement actifs des produits de Rag-1 et Rag-2 et le réarrangement des chaînes lourdes est effectué en présence des séquences nucléotidiques des gènes Rag-1 et Rag-2 et du gène de la terminale désoxynucléotidyle transférase ou de gènes conduisant
20 à la synthèse de dérivés ou de fragments biologiquement actifs de Rag-1 , Rag-2 ou de la TdT.

Pour obtenir l'expression des chaînes lourdes des immunoglobulines en utilisera des vecteurs portant les segments V, D et J tandis que pour les chaînes
25 légères les vecteurs porteront les séquences V et J.

La présente invention est en outre relative à un procédé pour l'obtention de récepteurs des cellules lymphoïdes, et en particulier des cellules T, présentant une grande diversité structurale et
30 fonctionnelle par réarrangement des chaînes alpha, bêta, gamma et/ou delta des récepteurs des cellules T.

Elle a de plus pour objet un procédé , comprenant les étapes de :

a) transfection d'une préparation cellulaire

par un ou plusieurs vecteurs portant une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique dont on veut obtenir la variabilité et par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 ou l'expression des gènes Rag-1, Rag-2 et de la TdT;

- b) isolement de l'ADN des vecteurs des préparations cellulaires ;
- c) élimination des vecteurs n'ayant pas subi de recombinaison ;
- d) transformation d'hôtes cellulaires par les vecteurs résultant de l'étape c) , et
- e) sélection des hôtes cellulaires exprimant les molécules présentant la structure et/ou la fonction recherchée.

De manière avantageuse , ce procédé comprend les étapes de :

- a) co-transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs portant des gènes codant pour des chaînes légères non réarrangées et par un ou plusieurs vecteurs exprimant des gènes codant pour Rag-1 et Rag-2 , leurs dérivés et/ou leurs fragments , et
- b) co-transfection d'une autre préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs portant des gènes codant pour des chaînes lourdes non réarrangées et par un ou plusieurs vecteurs exprimant le gène de la terminale désoxynucléotidyle transférase ainsi que des gènes codant pour Rag-1 et Rag-2 ,
- c) isolement de l'ADN des vecteurs des deux préparations cellulaires ,
- d) élimination des vecteurs n'ayant pas subi de recombinaison ,
- e) transformation d'au moins deux cultures

10

bactériennes respectivement par les préparations de vecteurs obtenus à l'étape d) , amplification et préparation des ADN des vecteurs bactériens ,

5 f) mise en place sur un même vecteur des gènes codants pour les chaînes lourdes et légères ,

g) transformation d'hôtes cellulaires par le vecteur obtenu à l'étape f) , et

h) sélection des hôtes cellulaires exprimant des molécules immunoglobulines complètes .

10 On appelle hôtes cellulaires toutes bactéries ou cellules eucaryotes pouvant être transformées ou transfectées.

On appelle, dans la présente demande , vecteur, toute molécule d'ADN autorépliquative et pouvant être transférée d'une cellule à une autre . On utilise préférentiellement des plasmides dans les étapes a à h mais tout autre vecteur compatible avec les systèmes cellulaires et bactériens employés peut être avantageusement utilisé .

20 Les vecteurs obtenus à l'étape c) et n'ayant pas subi de recombinaison sont avantageusement éliminés par digestion enzymatique à un site spécifiquement reconnu par une endonucléase de restriction .

25 Les cellules préférentiellement utilisées dans les étapes a) et b) sont des fibroblastes ou des cellules lymphoïdes , ou tout autre type cellulaire ou lignée de cellules eucaryotes .

Il est à noter que les vecteurs utilisés contiennent de préférence , la région précoce de polyome afin de permettre leur répllication à l'état autonome dans des cellules eucaryotes .

30 La sélection des bactéries à l'étape h) est avantageusement effectuée par réplique sur filtre des

colonies bactériennes obtenues par étalement des bactéries sur boîtes de Pétri et criblage ultérieur [" Molecular cloning ; a Laboratory Manual " (Sambrok et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 5 1989)] avec des antigènes pour lesquels l'on veut obtenir des anticorps spécifiques .

On note de plus , que les vecteurs exprimant les anticorps ou les récepteurs des cellules lymphoïdes recherchés peuvent être modifiés 10 ultérieurement de façon à permettre l'expression d'immunoglobulines complètes dans des cellules eucaryotes , et en particulier , de façon à permettre leur glycosylation .

Les modes de mise en oeuvre des étapes a) à h) 15 sont à la portée de l'homme du métier . On peut de manière générale, se référer au " Molecular cloning; a Laboratory Manual" (Sambrok et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York , 1989)

Des mises de modes en oeuvre pratiques de ces 20 étapes sont aussi décrites dans l'article de Huse et al. (Science , volume 246, 1275-1281, 1989).

Notamment , le vecteur utilisé dans l'étape a) peut être le plasmide p Blue Script contenant une cassette du type fragment EcoRI- NotI de lambda Lcl 25 décrit dans cet article dans lequel sont insérés un segment V et un segment J fusionné à la région constante de la chaîne légère . Les segments VL et JL sont bordés par leurs séquences signal de recombinaison.

30 Le vecteur utilisé pour la co-transformation de l'étape b) peut être le plasmide p Blue Script contenant une cassette du type fragment NotI-EcoRI de lambda Hc2 décrit dans cet article dans lequel sont insérés un segment V, un segment D et un segment J

fusionné à la région CH1 de la chaîne lourde. Les segments VH, DH, et JH sont bordés par leurs séquences signal de recombinaison.

Les vecteurs d'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 utilisés dans les étapes a) et b) peuvent être ceux décrits par Oettinger et al. (Science, 248, 1517-1523, 1990).

Le vecteur de clonage portant le gène codant pour la terminale désoxynucléotidyle transférase peut être en particulier le plasmide pMTdT qui est un pcDNAII dans lequel a été inséré l'ADN complémentaire de la terminale désoxyribonucléotide transférase de souris .

Ce plasmide qui a été déposé le 10 Décembre 1991 auprès de la Collection Nationale de Culture des Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le n° I 1160 est un autre objet de la présente demande.

L'article de Huse et al. précédemment cité mentionne d'autre part plus particulièrement des modes de mise en oeuvre pratiques qui peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention .

En particulier , les vecteurs utilisés dans les étapes a) et b) peuvent être obtenus à partir d'une librairie construite comme décrit dans cet article .

Cette librairie peut être obtenue en clonant les fragments des chaînes légères et lourdes dans respectivement les vecteurs issus du phage lambda , lambda Lc1 et lambda Hc2. Ces vecteurs qui servent au clonage dans l'étape initiale de la construction de la librairie peuvent être excisés et donner naissance à un plasmide contenant des morceaux d'oligonucléotides correspondant aux chaînes lourdes et légères.

Ces vecteurs contiennent divers sites de restriction, et une séquence codante pour le peptide

leader du gène bactérien PelB qui a été précédemment
utilisé avec succès dans E. coli pour sécréter des
fragments Fab , un site de liaison des ribosomes , et
sur le vecteur lambda Hc2 une séquence correspondant
5 au décapeptide tag situé à l'extrémité C terminale de
l'insertion de la chaîne lourde . Le peptide tag
permet la purification des produits d'expression par
passage sur des colonnes d'immuno-affinité .

L'ADN à la base de la fabrication de la
10 librairie des chaînes lourdes est préférentiellement
de l'ADN humain afin de minimiser les risques de rejet
par l'organisme dans le cas d'utilisation de ces
anticorps en thérapeutique humaine.

La mise en oeuvre de l'étape f), qui est la
15 mise en place sur un même vecteur des gènes codant
pour les chaînes lourdes et légères peut-être
effectuée comme décrite page 1278 de l'article de Huse
et al. précédemment cité .

On digère ainsi la librairie de chaînes légères
20 par l'endonucléase de restriction coupant à un site
unique , on déphosphoryle les extrémités 5'
résultantes , et on digère ensuite les produits , par
une autre endonucléase de restriction Eco RI coupant à
un site unique .

25 L'ADN des vecteurs composant la librairie des
chaînes lourdes est clivé par l'endonucléase Hind-III
puis déphosphorylé et digéré par l'endonucléase Eco
RI.

Les ADN ainsi préparés sont mélangés et réunis
30 par ligation .

Après ligation , seuls les clones qui résultent
de la combinaison d'un fragment issu de la librairie
de chaînes lourdes et d'un fragment issu de la
librairie de chaînes légères , reconstituent un phage

viable .

Pour la construction des bibliothèques des chaînes lourdes et légères, on peut utiliser des préparations d'ADN messagers isolées à partir de cellules de l'organisme ou d'hybridomes . On synthétise alors dans un système d'amplification par PCR des ADN complémentaires correspondants. Ces techniques sont bien connues de l'homme du métier et sont notamment décrites dans " Molecular cloning a Laboratory Manual (Sambrook et al. 1989 , précédemment cité).

La sélection des bactéries exprimant les molécules complètes de l'étape h) est suivie par une étape de sélection des clones synthétisant les molécules que l'on souhaite obtenir .

L'assemblage des parties des chaînes lourdes et des chaînes légères ainsi obtenu peut conduire uniquement à l'obtention du fragment Fab. Le vecteur est alors modifié de façon à pouvoir coder pour le fragment Fc . Le produit d'expression de ce vecteur est alors un anticorps.

Dans le cas de la sélection de clones synthétisant des anticorps , une méthode de sélection peut être celle utilisée par Huse et al. (précédemment cité) pour la sélection de clones synthétisant des anticorps dirigés à l'encontre du paranitrophényle phosphonamidate (NPN) .

La méthode utilisée dans cet article consiste à faire des doubles sur feuille de nitrocellulose de clones étalés sur des boîtes de milieu de culture gélifié et de tester l'hybridation du NPN couplé à du sérum d'albumine bovine marqué à $1,125\text{I}$.

La présente invention a de plus pour objet des compositions pharmaceutiques, des médicaments et des réactifs de diagnostic contenant les produits obtenus

par l'un des procédés objet de la présente invention.

En particulier , les produits d'expression dans des cellules eucaryotes ou procaryotes transfectées par des plasmides recombinants portant des gènes
5 originaux du lapin ou de la souris peuvent être utilisés dans des coffrets de diagnostic humain ou vétérinaire .

La présente invention a en outre pour objet des compositions immunogènes et des anticorps obtenus par
10 l'un des procédés selon l'invention .

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples de mise en oeuvre suivants dans lesquels :

La figure 1 représente les séquences des
15 jonctions formées sur le plasmide pBlueRec après co-transfection avec pRag-1 et p Rag-2 dans des fibroblastes NIH-3T3 .

La figure 2 représente les séquences des jonctions formées sur le plasmide pBlueRec après co-
20 transfection avec des vecteurs codant pour Rag-1 , Rag-2 et la TdT dans des fibroblastes NIH-3T3.

La figure 3 représente les séquences de jonctions formées sur pBlueRec après co-transfection avec des vecteurs codant pour Rag-1 et Rag-2 dans les
25 lignées cellulaires BW1J, CHO-K1 et A.9 .

Sur ces trois figures , les séquences des plasmides recombinés sont alignées avec la séquence du plasmide d'origine pBlueRec qui est la première séquence en partant du haut des figures .

30 Sur ces trois figures , les nucléotides supposés être dus à des insertions de type P sont soulignés dans les parties centrales des figures , tandis que les insertions de type N figurées dans ces mêmes parties ne sont pas soulignées. Les délétions

sont représentées par des lignes discontinues.

EXEMPLES

Matériels et méthodes utilisés dans les exemples .

5 Lignée cellulaire

Les fibroblastes d'embryons de souris NIH-3T3 (ATCC CRL 6442) et les cellules A9 dérivées des cellules L , (ATCC CRL 6319) sont cultivés dans du DMEM complémenté avec 10% de sérum de fœtus de veau .

10 Les cellules d'hépatomes de souris BW1J sont cultivées comme indiqué par Cassio D. & Weiss M.C. (Somat Cell Genet, 5, 719-738, 1979) .

Les cellules d'ovaires d'hamster chinois CHO⁻K1 (ATCC CCL 61) sont cultivées dans du RPMI ,
15 complémentées avec 10% de sérum de fœtus de veau .

Les cellules pré-B BASP-1 (Choquet et al., Science, 235, 1211-1214, 1987) sont cultivées dans du RPMI complémenté avec 10% de sérum de fœtus de veau et 50 μ m de β -mercapto- éthanol.

20 Clonage du gène codant pour la terminale désoxynucléotidyle transférase de souris .

De l'ARN est préparé à partir de thymus de souris vieilles de 5 semaines comme décrit par Auffray et Rougeon (Europe J. Biochem., 107, 303-314, 1980) ,
25 du thiocyanate de guanidine 4M étant utilisé à la place d'urée 6M.

L'ARN poly-A est purifié en utilisant une chromatographie cellulose oligo DT et est analysé par Northern blot . La synthèse du simple brin est
30 effectuée à partir de 5 μ g d'ARN poly-A initialisé avec de l'oligo DT en utilisant la transcriptase inverse du MMLV (commercialisée par BRL).

La synthèse du double brin est effectuée en présence d'ADN polymérase I et de RNase H .

Des adaptateurs double brin portant des extrémités BstX1 sont liés au CDNA préparé de manière adéquate et clonés dans le site de restriction BstX1 du pCDNA2 (commercialisé par In Nitrogen).

5 La librairie d'ADN complémentaire de thymus de souris est criblée avec deux oligo-nucléotides mélangés correspondent respectivement aux séquences 121-142 et 1471-1494 de la séquence de l'ADN complémentaire de la TdT de souris .

10 Les clones d'ADN complémentaire positifs et que l'on suppose suffisamment longs pour contenir entièrement le gène codant pour la TdT de souris sont séquencés sur les deux brins par la méthode de la di-désoxyterminaison (Sanger et al., PNAS, 74, 5463-
15 5467, 1977) .

Vecteurs utilisés.

Le plasmide pBlueRec est décrit par Kallenbach et al. (1990) Nucleic Acid Research 18 , 6730) .

20 p Rag-1 et p Rag-2 ont été fournis par Oettinger et al. (précédemment cité).

L'ADN complémentaire de la TdT de souris est cloné dans le pCDNA1. L'expression de Rag-1 , Rag-2 et de la TdT sont sous le contrôle du promoteur du CMV.

Mise en évidence de la recombinaison spécifique

25 Les transfections sont effectuées par électroporation en suivant les indications données par Chu et al . (Nucleic Acid Research Res., 15, 1311-1326, 1987).

30 2.10^6 cellules sont transfectées avec 2,5 μ g de pBlueRec avec ou sans 6 μ g de p Rag-1 ou 4,8 μ g de p Rag-2.

Pour déterminer l'effet de la TdT sur l'insertion de région N , 4,5 μ g du vecteur d'expression de la TdT sont ajoutés aux trois

vecteurs mentionnés ci-dessus .

Les cellules sont récoltées après 40 à 48 heures d'incubation à 37°C , lavées avec du PBS et l'ADN plasmidique est préparé selon Birnboim et Doly (Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523, 1979).

Les culots d'ADN sont resuspendus dans 20 µl d'eau stérile . 7 µl de la solution d'ADN sont digérés par DpnI afin d'éliminer les plasmides qui ne sont pas répliqués.

40 µl d'une bactérie compétente XL1-Blue (commercialisée par Stratagène) sont transformés par électroporation et étalés sur des boîtes d'Agar LB contenant du XGal (80 µg/ml) , de l'IPTG (150 µM) de l'ampicilline (100 µg/ml) et de la tétracycline (10 µg/ml) .

La fréquence de réarrangement est calculée comme la quantité de colonies bleues x 3 sur le nombre total de clones.

Séquençage des clones recombinants

Les colonies bleues sont repiquées et isolées sur des boîtes d'agar LB contenant du XGal , de l'IPTG, de l'ampicilline et de la tétracycline .

Les préparations d'ADN sont effectuées selon la méthode décrite par Sambrook et al. . (Molecular cloning, Laboratory Manual précédemment cité) , puis traitées par de la RNase durant deux heures à température ambiante avant d'effectuer le séquençage du double brin .

EXEMPLE 1

Comparaison des fréquences de recombinaison dans les fibroblastes NIH-3T3 et dans les lignées cellulaires précurseurs des cellules B en présence de Rag-1 et Rag-2.

L'activité recombinatoire due à Rag-1 et Rag-2

19

dans les fibroblastes NIH-3T3 a été testée par transfection transitoire .

p Rag-1 et p Rag-2 sont co-transfectés dans des fibroblastes NIH3 avec le plasmide substrat pour la recombinaison pBlueRec.

Après 48 heures , l'ADN plasmidique est isolé et testé chez E.Coli pour la recombinaison .

La séquence LacZ de pBlueRec est interrompue par un fragment d'ADN de 280 paires de bases flanquée de deux RSS.

Le réarrangement site-spécifique va éliminer l'insertion et dans un cas sur trois va restaurer le cadre de lecture correcte , donnant naissance à des clones bleus après transformation de E.Coli.

Ce test rapide permet d'examiner un nombre important de réarrangements .

Des expériences de transfection avec p Rag-1 ou p Rag-2 seuls ne donnent pas naissance à des clones recombinants.

Comme indiqué sur le tableau I , on observe une fréquence de recombinaison importante quand les deux plasmides sont co-transfectés . De plus , la fréquence (moyenne géométrique = 1,26) est comparable à celle observée après transfection du substrat de recombinaison dans les cellules pré B , BASP1 (moyenne géométrique = 1,46) .

Afin de comparer les jonctions codantes formées après la recombinaison modulée par p Rag-1 et p Rag-2 dans les fibroblastes , avec les jonctions observées dans les cellules lymphoïdes , les jonctions sur les plasmides réarrangés obtenues après transfection des cellules NIH-3T3 sont séquencées .

Les séquences indiquées sur la figure 1 représentent des éléments de recombinaison

20

indépendants , c'est-à-dire issus de différentes expériences de transfection .

Sept jonctions sur 17 présentent ni délétions ni insertions .

5 Quatre jonctions ont des délétions sur un côté et quatre autres ont des délétions sur les deux côtés.

Seulement une jonction présente une insertion de type P de deux paires de bases associée à une délétion de deux paires de bases sur un des côtés de la jonction .

10 La dernière jonction présente une délétion d'une paire de base et une addition d'un nucléotide , qui peut être attribuée à l'heptamère et est probablement due à une excision imprécise.

15 EXEMPLE 2

Co-transfection par Rag-1 et Rag-2 et TdT des fibroblastes NIH-3T3.

Afin de tenter de reconstituer, la diversité jonctionnelle observée dans des cellules préB ou préT, des fibroblastes NIH-3T3 sont transfectés avec le vecteur d'expression de la TdT ainsi qu'avec p Rag-1 , p Rag-2 et pBlueRec.

Les plasmides recombinants sont séquencés .

25 Des transfections témoins effectuées avec le vecteur pCDNA1 sans l'ADN complémentaire de la TdT n'entraîne aucune insertion de régions N .

Comme l'indique la figure 2, 88 % des jonctions montrent qu'il y a eu insertion de régions N . La plupart des régions N sont de 1 à 4 nucléotides avec une moyenne de 3 nucléotides par jonction .

30 On observe néanmoins une insertion exceptionnelle de 18 nucléotides .

La TdT incorpore plus efficacement les résidus G que d'autres nucléotides . La fréquence des

insertions de nucléotides de type P semble augmenter dans cette expérience. Il doit cependant être remarqué qu'il est impossible de les distinguer des régions N .

EXEMPLE 3

5 Effet de Rag-1 et Rag-2 dans différents types de lignées cellulaires différenciées .

On a montré dans les exemples précédents , que Rag-1 et Rag-2 sont capables d'entraîner une activité de recombinaison dans des cellules relativement
10 indifférenciées que sont les fibroblastes NIH-3T3.

On a donc testé l'activité de ces deux gènes dans des cellules dans des états différenciés . Les résultats obtenus dans les lignées cellulaires BW1J , CHO-K1 et A9 sont indiqués sur le tableau 2.

15 On observe des variations entre les différentes lignées cellulaires, mais de manière surprenante, les fréquences de réarrangement dans des lignées BW1J et CHO-K1 sont clairement supérieures à celles obtenues pour les fibroblastes 3T3.

20 Les réarrangements peuvent être détectés 13 heures après la co-transfection avec pBlueRec , p Rag-1 et p Rag-2.

Le séquençage des plasmides recombinés montre que des délétions aux jonctions codantes ont lieu dans
25 les trois lignées cellulaires testées (figure 3).

Une seule insertion de nucléotide de type P est trouvée à la jonction d'un clone recombinant obtenu après transfection des lignées A9.

CONCLUSION.

30 L'ensemble de ces résultats montre qu'on obtient dans des lignées non différenciées des délétions nucléotidiques après co-transfection par p Rag-1 et p Rag-2. On observe de plus des insertions nucléotidiques de type P telles que définies par

Lafaille et al. (Cell, 59, 859-870, 1989) .

On remarque de plus que la co-expression de Rag-1, Rag-2 et TdT dans des cellules non différenciées conduit à des insertions de type N.

5 L'ensemble de ces résultats indique donc que Rag-1 et Rag-2 suffisent à induire une recombinaison site-spécifique mais que la présence de la TdT , en combinaison avec Rag-1 et Rag-2, est nécessaire pour
10 obtenir des insertions de type N qui sont le reflet de l'expression de la diversité de synthèse des immunoglobulines et des récepteurs des cellules lymphoïdes .

TABLEAU 1

Réarrangements dans les fibroblastes et dans les précurseurs
de cellules B

Lignée cellulaire	ADN	colonies Amp ^R		R = $\frac{3 \times \text{Bleu} \times 10^{-2}}{\text{Total}}$	
		Total	Bleu	Total	
NIH-3T3	pBlueRec	70.000	0	0	
	pBlueRec, pRag1	34.860	0	0	
	pBlueRec, pRag2	12.140	0	0	
	pBlueRec, pRag1, pRag2	144.000	183	0,38	
	pBlueRec, pRag1, pRag2	38.000	128	1	
BASP-1	pBlueRec, pRag1, pRag2	60.000	1059	5,3	
	pBlueRec	14.400	186	1,3	
	pBlueRec	14.800	237	1,6	
	pBlueRec	12.960	190	1,5	
	pBlueRec				

R = fréquence de recombinaison .

TABLEAU 2
Fréquence de réarrangement dans trois lignées
cellulaires

Lignée cellulaire	ADN	colonies amp ^R		R= $\frac{3 \times \text{Bleu} \times 10^{-2}}{\text{Total}}$
		Total	Bleu	
A9	pBlueRec	16.800	0	0
	pBlueRec, pRag-1, pRag-2	5.620	71	3,8
	pBlueRec	12.000	0	0
BW1J	pBlueRec, pRag1-pRag-2	5.600	83	4,4
	pBlueRec, pRag1-pRag2	1.800	8	1,3
	pBlueRec	16.000	1050	19,6
	pBlueRec	3.434	0	0
CHO-K1	pBlueRec, pRag1, pRag2	2.300	38	4,9
	pBlueRec, pRag1, pRag2	1.996	149	22,3

R = fréquence de recombinaison

REVENDICATIONS

1. Composition contenant des séquences nucléotidiques portant les gènes Rag-1 et Rag-2 ou des gènes conduisant à la synthèse de fragments ou de dérivés biologiquement actifs des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 et le gène codant pour la TdT ou un de ses fragments ou dérivés biologiquement actifs.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que les séquences nucléotidiques sont portées sur des vecteurs.

3. Composition comprenant les plasmides pBlueRec, p Rag-1 et p Rag-2.

4. Composition contenant en combinaison dans des quantités synergiques les produits d'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 et une terminale désoxynucléotidyle transférase ou un ou plusieurs de leurs fragments ou dérivés biologiquement actifs.

5. Procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par délétions ou insertions aléatoires de nucléotides dans une séquence nucléotidique codant pour cette séquence peptidique, ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs permettant l'expression des produits des gènes Rag-1, Rag-2 et de la terminale désoxynucléotidyle transférase (TdT) ou de leurs dérivés et par un vecteur identique ou différent portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences de recombinaison RSS ou bordée par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS.

6. Procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par délétions ou insertions aléatoires de

nucléotides dans une séquence nucléotidique codant pour cette séquence peptidique, ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation cellulaire par un vecteur portant ladite séquence
5 nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences de recombinaison RSS ou bordée par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS , puis dans une seconde étape par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des
10 produits des gènes Rag-1 , Rag-2 et de la terminale désoxynucléotidyle transférase ou de leurs dérivés .

7. Procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par introduction dans la séquence
15 nucléotidique correspondant à cette séquence peptidique d'insertions ou de délétions résultant de la répétition inverse de séquences adjacentes à des séquences de recombinaison RSS ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation
20 cellulaire par un ou plusieurs vecteurs permettant l'expression des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 ou de leurs dérivés et par un vecteur identique ou différent portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences RSS ou par un ou
25 plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS .

8. Procédé de génération d'une diversité structurale ou fonctionnelle dans une séquence peptidique par introduction dans la séquence
30 nucléotidique correspondant à cette séquence peptidique d'insertions ou de délétions résultant de la répétition inverse de séquences adjacentes à des séquences de recombinaison RSS , ledit procédé comprenant la transfection d'une préparation

cellulaire par un vecteur portant ladite séquence nucléotidique bordée par une ou plusieurs séquences RSS ou par un ou plusieurs dérivés biologiquement actifs des séquences RSS , puis dans une seconde étape
5 par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des produits des gènes Rag-1 et Rag-2 ou de leurs dérivés .

9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le ou les vecteurs recombinés
10 portant la séquence nucléotidique correspondant à la séquence peptidique sont transférés dans des bactéries afin de sélectionner les protéines présentant la structure et/ou la fonction souhaitée.

10. Procédé selon l'une des revendications 5 à
15 9, pour l'obtention d'immunoglobulines et notamment d'anticorps présentant une grande diversité structurale et fonctionnelle par réarrangement séparé des chaînes légères et lourdes et co-expression des deux chaînes .

20 11. Procédé selon l'une des revendications 5 à 9, pour l'obtention de récepteurs des cellules lymphoïdes , et en particulier des cellules T , présentant une grande diversité structurale et fonctionnelle par réarrangement des chaînes alpha,
25 bêta, gamma et/ou delta des récepteurs des cellules T.

12. Procédé selon la revendication 10 , caractérisé en ce que le réarrangement des chaînes légères est effectué en présence des séquences nucléotidiques des gènes Rag-1 et Rag-2 ou de gènes
30 conduisant à la synthèse de dérivés ou de fragments biologiquement actifs des produits des gènes Rag-1 et Rag-2.

13. Procédé selon la revendication 10 , caractérisé en ce que le réarrangement des chaînes

lourdes est effectué en présence des séquences nucléotidiques des gènes Rag-1, Rag-2, et du gène de la terminale désoxynucléotidyle transférase ou de gènes conduisant à la synthèse de dérivés ou de fragments biologiquement actifs de Rag-1, Rag-2 et de la TdT.

14. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8 , comprenant les étapes de :

a) transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs portant une séquence nucléotidique codant pour la séquence peptidique dont on veut obtenir la variabilité et par un ou plusieurs vecteurs identiques ou différents permettant l'expression des gènes Rag-1 et Rag-2 ou l'expression des gènes Rag-1, Rag-2 et de la TdT;

b) isolement de l'ADN des vecteurs des préparations cellulaires ;

c) élimination des vecteurs n'ayant pas subi de recombinaison ;

d) transformation d'hôtes cellulaires par les vecteurs résultant de l'étape c) , et

e) sélection des hôtes cellulaires exprimant les molécules présentant la structure et/ou la fonction recherchée.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite séquence peptidique est une chaîne alpha, bêta, delta, ou gamma des récepteurs des cellules lymphoïdes ou un de leurs fragments ou un de leurs dérivés.

16. Procédé selon l'une des revendications 10, 12 et 13 , comprenant les étapes de :

a) co-transfection d'une préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs portant des séquences nucléotidiques codant pour des chaînes légères non-

réarrangées et par un ou plusieurs vecteurs exprimant les gènes Rag-1 et Rag-2 leurs dérivés et/ou leurs fragments, et

5 b) co-transfection d'une autre préparation cellulaire par un ou plusieurs vecteurs portant des séquences nucléotidiques codant pour des chaînes lourdes non-réarrangées et par un ou plusieurs vecteurs exprimant le gène de la terminale désoxynucléotidyle transférase ainsi que les gènes
10 Rag-1 et Rag-2 , leurs dérivés et/ou leurs fragments ,

 c) isolement de l'ADN des vecteurs des deux préparations cellulaires ,

 d) élimination des vecteurs n'ayant pas subi de recombinaison ,

15 e) transformation d'au moins deux cultures bactériennes respectivement par les deux préparations obtenues à l'étape d) , amplification et préparation des ADN des vecteurs bactériens ,

20 f) mise en place sur un même vecteur des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères ,

 g) transformation d'hôtes cellulaires par le vecteur obtenu à l'étape f) , et

 h) sélection des hôtes cellulaires exprimant des molécules d'immunoglobulines complètes .

25 17. Procédé selon la revendication 16 , caractérisé en ce que les vecteurs obtenus à l'étape c) et n'ayant pas subi de recombinaison sont éliminés par digestion enzymatique.

30 18. Procédé selon la revendication 16 , caractérisé en ce que les préparations cellulaires sont des fibroblastes ou toute autre cellule eucaryote.

 19. Plasmide pMTdT portant le gène de la terminale désoxyribonucléotidyle transférase déposé

auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes sous le N° I 1160.

20. Procédé selon la revendication 16 ,
caractérisé en ce que le vecteur exprimant la
5 terminale désoxyribonucléotidyle transférase est le
plasmide selon la revendication 19 .

21. Composition pharmaceutique contenant une
quantité efficace d'au moins une protéine ou peptide
obtenu par le procédé selon l'une des revendications 4
10 à 18 et 20 en association avec un ou plusieurs
diluants ou adjuvants compatibles et
pharmaceutiquement acceptables .

22. Médicament contenant au moins une protéine
ou peptide obtenu par le procédé selon l'une des
15 revendications 4 à 18 et 20 .

23. Réactif de diagnostic contenant au moins
une protéine ou un peptide obtenu par le procédé selon
l'une des revendications 4 à 18 et 20 .

24. Coffret pour le diagnostic comprenant au
20 moins l'un des réactifs selon la revendication 22.

25. Composition immunogène contenant au moins
une protéine ou un peptide obtenu par le procédé selon
l'une des revendications 4 à 18 et 20.

26. Anticorps obtenu par le procédé selon l'une
25 des revendications 4 à 18 et 20.

1/3

Figure 1

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC-CACAGTG-(12)
 (23)-CACTGTG-GTCGACCTCGAGGGG

CCGCTCTAGAACTAGTGGAT--		----ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG----		--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTG-----		-----TCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	<u>GG</u>	--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG----		--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	C	-TCGACCTCGAGGGG

Figure 2

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC-CACAGTG-(12)

(23)-CACTGTG-GTCGACCTCGAGGGG

CCGCTCTAGAACTAGTGG----	GTTQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	GG	-----CCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG----	GGCQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTC-----	TTTQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGT-----	TT	-----CCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG--j-	G	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	CCA	---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACT-----	T	-TCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	GAC	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	ATC	--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	A	----ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTG-----		----ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	TCQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	CTQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	GTCQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATC-	GGG	-----CCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	GAG	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATC-	G	---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGAT--	ACCATACCCCTTTACCA	-TCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	CCCCCGCQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	TCCT	-----CCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATC-	AC	----ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	CC	---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAG-----	CCCTAC	--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	CCC	--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	TCC	--CGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGAT--	TQ	GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG-----	TC	-TCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	A	----ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	CCQ	GTCGACCTCGAGGGG

Figure 3

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC-CACAGTG- (12)
 (23)-CACTGTG-GTCGACCTCGAGGGG

BW1J

CCGCTCTAGAACTAGTGG----	----	GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGG----	----	ACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG

CHO-K1

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		---GACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG

A9

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC	<u>GG</u>	-----CCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATCC		GTCGACCTCGAGGGG
CCGC-----		---GACCTCGAGGGG
CCGC-----		GTCGACCTCGAGGGG
CCGCTCTAGAACTAGTGGATC-		---GACCTCGAGGGG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/01178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C12N15/10; C12N15/12; C12N15/54; C12N15/85
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
 C07K15/28; A61K39/395; G01N33/577

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C12N ; C07K ; A61K ; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCL. ACID RES. Vol. 18, No. 22, 25 November 1990, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; page 6730 S.KALLENBACH ET AL. 'A rapid test for V(D)J recombinase activity' cited in the application the whole see figure 1	3
Y	SCIENCE, Vol. 248, 22 June 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1517 - 1523 M.A. OETTINGER ET AL. 'RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination' cited in the application see page 1521, right-hand column, line 11 - page 1522, left-hand column, line 20 -/-	1-18, 21-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 26 February 1993 (26.02.93)

Date of mailing of the international search report
 05 March 1993 (05.03.93)

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/FR 92/01178

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE Vol. 246, 8 December 1989, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1275 - 1281 W.D. HUSE ET AL. 'Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda' cited in the application see page 1275, left-hand column, line 1 - page 1276, left-hand column, line 20; figure 1	9-18, 21-26
Y	CELL Vol. 59, 22 December 1989, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA.; pages 1035 - 1048 D.G. SCHATZ ET AL. 'The V(D)J recombination activating gene, RAG-1' see page 1044, right-hand column, line 54 - line 57	1-18
Y	NUCL. ACID RES. Vol. 14, No. 14, 25 July 1986, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 5777 - 5792 O. KOIWAI ET AL. 'Isolation and characterization of bovine and mouse terminal deoxynucleotidyltransferase cDNAs expressible in mammalian cells' see page 5778, line 7 - line 20	1-2, 4-6, 9-26
Y	MOL. CELL. BIOL. Vol. 7, No. 9, September 1987, AM.SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C pages 3237 - 3243 N.R. LANDAU ET AL. 'Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyltransferase retroviral expression vector' see page 3241, right-hand column, line 20 - page 3242, right-hand column, line 3; table 2	1, 2, 4-6, 9-26
P, X	PROC. NATL. ACAD SCI. Vol. 89, No. 7, 1 April 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 2799 - 2803 S.KALLENBACH ET AL. 'Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes' see page 2801, right-hand column, line 27 - page 2803, left-hand column, line 14 see page 2800, left-hand column, line 45 - page 2801, right-hand column, line 24	1-20

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 C12N15/10; C07K15/28;	C12N15/12; A61K39/395;	C12N15/54; G01N33/577
C12N15/85		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K ; A61K ; G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	<p>NUCL. ACID RES. vol. 18, no. 22, 25 Novembre 1990, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; page 6730 S. KALLENBACH ET AL. 'A rapid test for V(D)J recombinase activity' cité dans la demande En entier voir figure 1</p> <p align="center">---</p> <p align="right">-/--</p>	3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p align="center">26 FEVRIER 1993</p>	<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p align="center">15. 03. 93</p>	
<p>Administration chargée de la recherche internationale</p> <p align="center">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</p>	<p>Signature du fonctionnaire autorisé</p> <p align="center">HORNIG H.</p>	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)	
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸		
Y	<p>SCIENCE, vol. 248, 22 Juin 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1517 - 1523 M.A. OETTINGER ET AL. 'RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination' cité dans la demande voir page 1521, colonne de droite, ligne 11 - page 1522, colonne de gauche, ligne 20</p> <p>---</p>	1-18, 21-26		
Y	<p>SCIENCE vol. 246, 8 Décembre 1989, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1275 - 1281 W.D. HUSE ET AL. 'Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda' cité dans la demande voir page 1275, colonne de gauche, ligne 1 - page 1276, colonne de gauche, ligne 20; figure 1</p> <p>---</p>	9-18, 21-26		
Y	<p>CELL vol. 59, 22 Décembre 1989, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA.; pages 1035 - 1048 D.G. SCHATZ ET AL. 'The V(D)J recombination activating gene, RAG-1' voir page 1044, colonne de droite, ligne 54 - ligne 57</p> <p>---</p>	1-18		
Y	<p>NUCL. ACID RES. vol. 14, no. 14, 25 Juillet 1986, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 5777 - 5792 O. KOIWAI ET AL. 'Isolation and characterization of bovine and mouse terminal deoxynucleotidyltransferase cDNAs expressible in mammalian cells' voir page 5778, ligne 7 - ligne 20</p> <p>---</p>	1-2, 4-6, 9-26		-/--

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie ^a	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	MOL. CELL. BIOL. vol. 7, no. 9, Septembre 1987, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C pages 3237 - 3243 N.R. LANDAU ET AL. 'Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector' voir page 3241, colonne de droite, ligne 20 - page 3242, colonne de droite, ligne 3; tableau 2 ---	1,2,4-6, 9-26
P,X	PROC. NATL. ACAD SCI. vol. 89, no. 7, 1 Avril 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 2799 - 2803 S. KALLENBACH ET AL. 'Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes' voir page 2801, colonne de droite, ligne 27 - page 2803, colonne de gauche, ligne 14 voir page 2800, colonne de gauche, ligne 45 - page 2801, colonne de droite, ligne 24 -----	1-20